

УДК 577.21

ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ ПОСТТРАНСКРИПЦИОННЫХ ЗАМЕН ТИРОЗИНОВЫХ ОСТАТКОВ НА ЦИСТЕИНОВЫЕ НА ТРАНСФОРМАЦИЮ АМИЛОИДОГЕННЫХ БЕЛКОВ

Мини-обзор

© 2022 В.И. Муронец^{1,2*}, Д.В. Поздышев¹, М.В. Медведева², И.А. Севостьянова¹

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: vimuronets@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 25.11.2021

После доработки 12.01.2022

Принята к публикации 12.01.2022

В обзоре рассмотрены причины и следствия посттранскрипционных замен тирозиновых остатков на цистеиновые. Основное внимание уделено заменам Tug-Cys, которые возникают при экспрессии генов в бактериальных системах на стадии трансляции белков в результате неправильного узнавания сходных кодонов мРНК. Отмечено, что если в целом ошибки трансляции возникают относительно редко, от 10^{-3} до 10^{-4} ошибок на кодон для *E. coli*, то в некоторых случаях частота ошибок существенно возрастает. Например, это характерно для определенных пар кодонов при изменении условий культивирования или в присутствии антибиотиков. Так, при суперпродукции рекомбинантного альфа-синуклеина человека в клетках *E. coli* содержание мутантной формы с заменой 136-го тирозинового остатка (кодон UAC) на цистеиновый (кодон UGC) может достигать 50%. Рассмотрены возможные причины повышенной продукции альфа-синуклеина с заменами Tug136Cys, а также последствия присутствия мутантных форм в препаратах амилоидогенных белков при изучении их патологической трансформации *in vitro*. Отдельный раздел посвящен заменам Tug-Cys, ассоциированным с редактированием мРНК аденозиндезаминазами, характерным для эукариотических организмов, и возможной роли этого процесса в амилоидной трансформации белков, связанных с нейродегенеративными заболеваниями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амилоидогенные белки, ошибки трансляции, замены Tug-Cys, синуклеин, продукция белков в бактериях, амилоидогенез.

DOI: 10.31857/S0320972522020051

ВВЕДЕНИЕ

На пути передачи информации от молекулы ДНК до синтезируемой полипептидной цепи белка возможно появление ошибок, которые могут существенно изменять свойства белковой молекулы. В обзоре мы остановимся только на механизмах замены остатков тирозина на остатки цистеина, поскольку такая замена кардинально влияет на физико-химические свойства белка. Особое влияние такие замены оказывают на способность белков формировать агрегаты, в том числе и амилоидные. Появление дополнительных остатков цистеина может не только создавать препятствия для правильного формирования пространственной структуры белка, но и приводить к образованию дисульфидных связей

между полипептидными цепями, стабилизировать агрегаты и влиять на амилоидную трансформацию белков. Нельзя также исключать возможность появления дополнительных активностей у белков из-за возникновения сульфгидрильных групп, способных участвовать в различных реакциях, прежде всего связанных с окислительно-восстановительными процессами.

Существуют два основных механизма возникновения ошибок при передаче информации от молекулы ДНК до полипептидной цепи – редактирование матричной РНК или «неточное» функционирование рибосомного аппарата. Редактирование мРНК может происходить в результате сплайсинга или под действием аденозиндезаминаз или цитозиндезаминаз. Мы рассмотрим только редактирование мРНК аденозиндезаминазами, поскольку именно воздействие этих ферментов может вызывать точечные

* Адресат для корреспонденции.

замены аминокислотных остатков, которые являются темой данного обзора. Дезаминирование мРНК аденозиндезаминазами приводит к превращению аденозина в инозин, «узнаваемый» в процессе трансляции белка как гуанозин. Остатки тирозина кодируются в ДНК двумя кодонами, TAT и TAC, а в мРНК, соответственно, UAU и UAC. Следовательно, при дезаминировании аденозина мРНК они распознаются как цистеиновые кодоны UGU и UGC, что и приводит к замене остатков тирозина на остатки цистеина в полипептидной цепи.

Редактирование мРНК, приводящее к замене аденозина на инозин – широко распространенное для эукариот явление, однако его функциональная роль до конца не изучена. Дезаминирование аденозина осуществляется группой ферментов из семейства ADAR. Так, у человека семейство представлено тремя белками – ADAR1, ADAR2 и ADAR3 [1]. Ферментативная активность для ADAR3 на сегодняшний день не продемонстрирована; предполагают, что он выступает в качестве регулятора процесса редактирования [2]. Для замены аденозина на инозин необходимо взаимодействие ADAR1 или ADAR2 с двуцепочечной РНК. Показано участие белков ADAR в регуляции процессов врожденного иммунитета, циркадных ритмов, развития нервной системы [3]. Существуют свидетельства в пользу того, что нарушения в работе аденозиндезаминаз ассоциированы с развитием аутоиммунных [4] и онкологических заболеваний [5]. Следует также отметить, что редактирование мРНК аденозиндезаминазами в клетках нервных тканей протекает особенно интенсивно. В связи с этим накапливается все больше данных о важности роли аденозиндезаминаз в регуляции функционирования нервных клеток и о взаимосвязи активности этих ферментов и развития нейродегенеративных заболеваний [6].

Сходство кодонов, кодирующих остатки тирозина и цистеина, может приводить к соответствующим заменам в полипептидных цепях и по другой причине. Такие ошибки при считывании информации в процессе трансляции могут быть связаны с неточным узнаванием кодонов некоторыми аминоацил-тРНК. При этом, если редактирование мРНК интенсивно протекает в эукариотических организмах, то ошибки, возникающие в процессе трансляции, характерны для прокариот. Интересно, что для дрожжей, относящихся к эукариотам, были также обнаружены ошибки, возникающие при трансляции, что может указывать на определенные особенности аппарата трансляции у этих организмов.

В обзоре будут суммированы данные о редактировании мРНК аденозиндезаминазами, кото-

рые могут приводить к точечным заменам аминокислотных остатков, прежде всего, остатков тирозина на остатки цистеина, а также о возможной взаимосвязи этих процессов с нейродегенеративными заболеваниями. Отдельно будет рассмотрена проблема, связанная с получением рекомбинантных белков, продуцируемых в бактериальных системах, в которых происходит замена остатков тирозина на остатки цистеина. Такая замена у части белковых молекул может существенно изменять физико-химические характеристики белков и приводить к неверной интерпретации полученных результатов.

ОШИБКИ ТРАНСЛЯЦИИ У ПРОКАРИОТ

У прокариотических организмов ошибки при передаче информации от ДНК к белку возникают в процессе трансляции из-за неточного узнавания кодонов мРНК некоторыми аминоацил-тРНК. Известно, что в целом частота таких ошибок при трансляции невелика и составляет для *E. coli* при использовании разных способов оценки от 10^{-3} до 10^{-4} ошибок на кодон [7–9]. Однако вероятность ошибки зависит от многих факторов, прежде всего от условий культивирования и сходства между кодонами. Более подробно особенности неправильного считывания разных кодонов были исследованы на примере люциферазы светлячков, продуцируемой в *E. coli* [10]. Замена важного для катализа остатка лизина (Lys529) в люциферазе должна приводить к исчезновению ферментативной активности. Тем не менее в препаратах рекомбинантных мутантных форм люциферазы, содержащих разные замены по 529-му остатку, сохранялась ферментативная активность. Было высказано предположение, что сохранение люциферазной активности происходит из-за синтеза некоторого количества белка дикого типа, обусловленного неправильным считыванием кодонов в 529-м положении из-за конкуренции между тРНК^{Lys}_{UUU} и другими тРНК. Было показано, что частота ошибок у *E. coli* зависит от конкуренции между родственными тРНК за сходные кодоны. Например, замены на остатки лизина остатков аргинина (кодона AGA и AGG) происходят в 10 раз чаще, чем замены других аминокислотных остатков у мутантных форм белка. Об этом свидетельствует более высокая ферментативная активность мутантных форм, содержащих остаток аргинина в 529-м положении. Важно также отметить, что в присутствии некоторых антибиотиков в несколько раз увеличивается частота ошибок в процессе трансляции, причем величина наблюдаемого эффекта зависит также от типа

тРНК. Аминогликозидные антибиотики существенно увеличивают частоту ошибок для сходных кодонов, но практически не изменяют число ошибок по кодонам в целом. Так, для кодона AAU, кодирующего аспарагин, частота ошибок в присутствии паромомицина увеличивается почти в 10 раз и достигает $1,3 \times 10^{-2}$ [10]. Снижение точности трансляции в присутствии аминогликозидных антибиотиков, а также при добавлении ионов магния было подтверждено и в других работах [11, 12].

С развитием методов масс-спектрометрии накапливается все больше данных о заменах аминокислотных остатков в рекомбинантных эукариотических белках, продуцируемых в бактериальных системах [13–15]. Как правило, такие замены характерны для редких в бактериальных системах кодонов [14–17]. Например, при использовании редкого кодона GGA в продуцируемых в *E. coli* белках происходила замена остатков глутаминовой кислоты на остатки глицина [16]. Наблюдались также замены лизиновых остатков (AAA) на аргининовые (AGA) [17] и аргининовых на лизиновые [15], а также аргининовых (CGG) на глутаминовые (CAG) [14]. В полученных препаратах содержание белков с возникшими в процессе трансляции заменами может достигать 10–40% [14, 15, 17].

ОШИБКИ ТРАНСЛЯЦИИ В ДРОЖЖАХ

Принято считать, как уже отмечалось выше, что неправильное считывание информации на пути от ДНК к белкам для прокариот обусловлено ошибками в процессе трансляции, а для эукариот — редактированием мРНК дезаминазами. Однако достаточно высокий уровень ошибок при трансляции был обнаружен и у некоторых эукариот, а именно у пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [18, 19]. Так, с использованием описанной выше системы детекции с люциферазой было показано, что частота ошибок варьирует от 4×10^{-5} до $6,9 \times 10^{-4}$ на кодон, т.е. в среднем в 3 раза ниже, чем для бактериальной системы [19]. При этом для дрожжей характерно более избирательное действие аминогликозидных антибиотиков. Так, для одних кодонов добавление паромомицина не влияет на частоту ошибок, а для других — увеличивает количество ошибок в несколько раз. Авторы предполагают, что в пекарских дрожжах существуют дополнительные механизмы, предотвращающие неточную трансляцию, в отличие от *E. coli*. Возможно, именно более точная работа эукариотических рибосом может снижать вероятность возникновения ошибок в процессе трансляции.

Однако нельзя исключить, что ошибки в процессе трансляции из-за конкуренции между тРНК все-таки происходят и у других эукариотических организмов, хотя и с меньшей частотой. К сожалению, пока не получено экспериментальных данных, подтверждающих или опровергающих такое предположение.

ОШИБКИ ТРАНСЛЯЦИИ, ПРИВОДЯЩИЕ К ЗАМЕНЕ ТИРОЗИНОВЫХ ОСТАТКОВ НА ЦИСТЕИНОВЫЕ

Тирозиновые остатки кодируются в матричной РНК двумя кодонами — UAU и UAC, а цистеиновые остатки сходными кодонами — UGU и UGC. Как было отмечено во введении, редактирование мРНК аденозиндезаминазами может приводить к заменам тирозиновых остатков на цистеиновые у эукариот. Однако для прокариот из-за отсутствия аденозиндезаминаз характерен другой механизм — появление ошибок в процессе трансляции из-за неправильного узнавания кодонов. Механизм такой замены схематически представлен на рис. 1. В верхней части рисунка продемонстрирована конкуренция за связывание между разными аминокислот-тРНК с UAC-кодоном мРНК в А-сайте рибосомы. Вследствие неточной работы трансляционного аппарата происходит неверное считывание кодона и появление в полипептидной цепи цистеинового остатка вместо тирозинового. Цистеиновые остатки могут образовывать дисульфидные связи, соединяющие полипептидные цепи.

Первые указания на возможность замены тирозиновых остатков на цистеиновые были получены в середине 80-х годов. Было показано, что при синтезе *in vivo* белка Osg бактериофага T7 происходит включение остатков цистеина в положение, обычно занимаемое тирозиновым остатком [20]. В дальнейшем избирательно замены именно тирозиновых остатков на цистеиновые не исследовали, хотя исходя из характерной для *E. coli* частоты ошибок, можно было ожидать, что она должна быть не слишком высокой и составлять от 10^{-3} до 10^{-4} ошибок на кодон. Однако при экспрессии человеческого альфа-синуклеина в клетках *E. coli* было обнаружено, что у значительной части синтезированного белка Tyr136 (кодон UAC) заменен на остаток цистеина [21, 22]. При этом замен других остатков тирозина, кодируемых триплетом UAU, обнаружено не было. Замена одного из нуклеотидов в кодирующем 136-й тирозиновый остаток кодоне (UAU) полностью предотвращала возникновение мутантного белка с такими заменами [21]. Оказалось также, что эффектив-

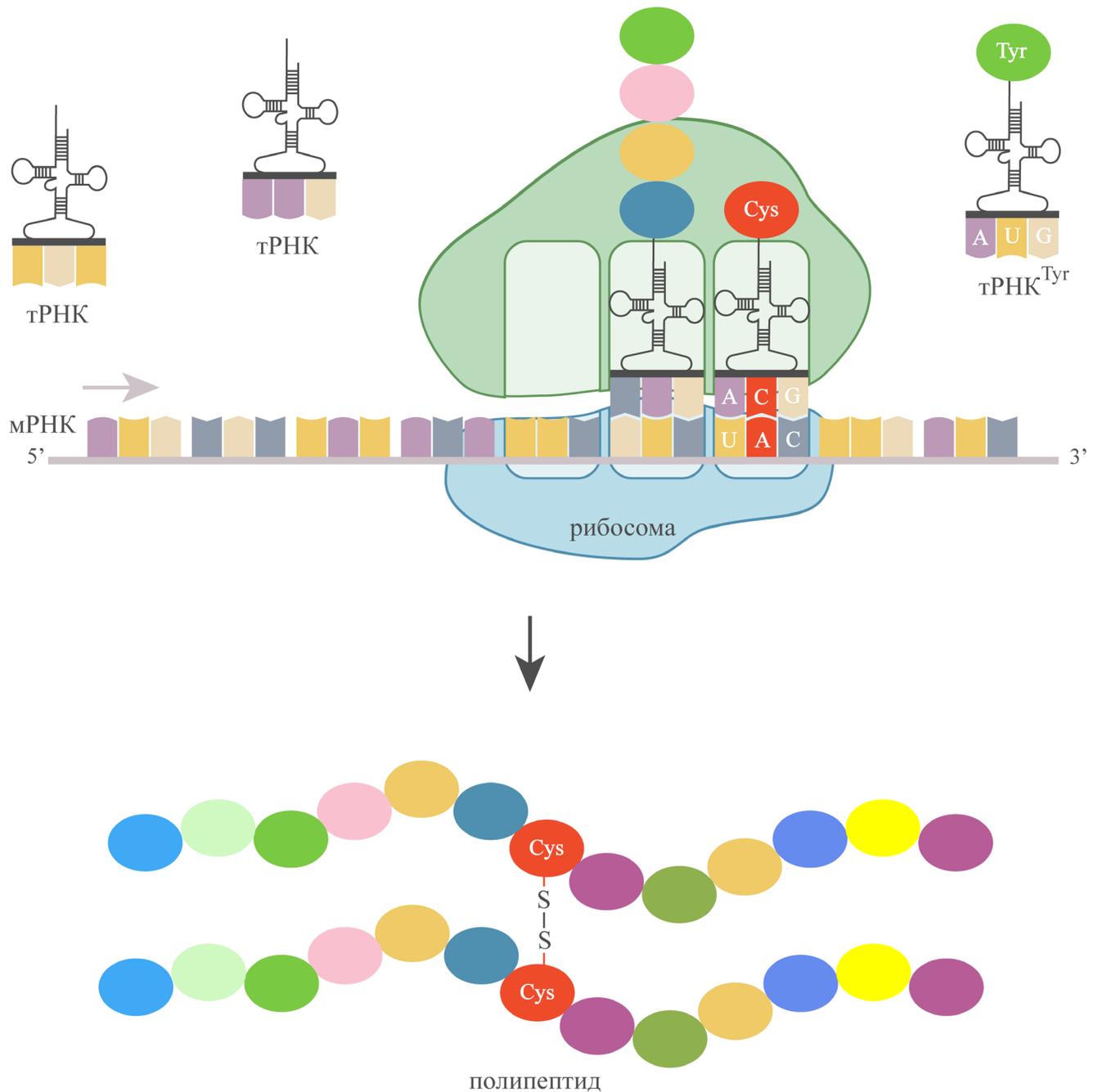


Рис. 1. Ошибки считывания кодонов в процессе трансляции белков у прокариот. Конкуренция за связывание между разными аминоксил-тРНК с UAG-кодоном мРНК в А-сайте рибосомы. Неточная работы трансляционного аппарата приводит к неверному считыванию кодона и к появлению в полипептидной цепи цистеинового аминокислотного остатка вместо тирозинового. Сшивка полипептидных цепей дисульфидными связями через цистеиновые остатки

ность замены 136-го тирозинового остатка на остаток цистеина зависит от рН клеточной среды для культивирования клеток: при закислении среды до рН 6,6 содержание мутантного альфа-синуклеина, содержащего в 136-м положении остаток цистеина, достигало 50% [22]. Идентифицировать появление мутантных форм

было довольно просто, т.к. содержащие цистеиновый остаток молекулы альфа-синуклеина образовывали соединенные дисульфидной связью димеры. Такие димеры можно было обнаружить при проведении электрофореза в денатурирующих условиях без добавления бета-меркаптоэтанолла. Вероятно, частота ошибок в процессе

трансляции альфа-синуклеина возрастала из-за использования аминокликозидного антибиотика канамицина при культивировании клеток, как это было показано ранее для других рекомбинантных белков. Кроме того, содержание мутантного белка может увеличиваться из-за недостатка тирозина в условиях суперпродукции рекомбинантного белка.

ВОЗМОЖНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ОШИБОК, ПРИВОДЯЩИХ К ЗАМЕНЕ ТИРОЗИНОВЫХ ОСТАТКОВ НА ЦИСТЕИНОВЫЕ

При получении рекомбинантных белков в бактериальных системах обычно не обращают внимания на возможные замены аминокислотных остатков из-за ошибок, возникающих в процессе трансляции. Прежде всего, это связано с невысокой частотой возникновения таких ошибок. Кроме того, часто замены аминокислотных остатков приводят к неправильному сворачиванию белковой глобулы и такие белки, формирующие ненативные структуры, подвергаются протеолитическому расщеплению. Однако, как показывают приведенные в предыдущем разделе примеры [21, 22], в некоторых случаях образуются значительные количества мутантных белков, содержащих замены аминокислотных остатков. Возможно, накопление мутантного альфа-синуклеина в описанных примерах облегчается тем, что он относится к так называемым «естественно развернутым белкам», и его деградация не регулируется характерными для глобулярных белков механизмами.

При исследовании рекомбинантного мутантного альфа-синуклеина, содержащего цистеиновый остаток в 136-м положении, было показано, что для такого белка не характерна амилоидная трансформация. Более того, мутантный альфа-синуклеин препятствовал формированию амилоидных фибрилл нативными формами альфа-синуклеина [22]. Вполне возможно, что некоторые результаты, полученные на препаратах рекомбинантного альфа-синуклеина, содержащего примеси мутантной формы с заменами Tyr136Cys, некорректны из-за воздействия мутантной формы на трансформацию альфа-синуклеина дикого типа. К сожалению, принятые процедуры оценки гомогенности препаратов рекомбинантных белков, включающие только проведение электрофореза в денатурирующих условиях в присутствии бета-меркаптоэтанолла, не позволяют выявить примесь соединенных дисульфидными связями полипептидных цепей. Более того, при масс-спектрометрии не всегда легко обнаружить такие замены, исследуя

смесь исходного и мутантного белка, из-за модификаций цистеиновых остатков, особенностей экстракции цистеин-содержащих полипептидов из гелей и ряда других причин. Следовательно, следует внимательно отслеживать возможные ошибки трансляции при получении рекомбинантных белков в бактериальных системах. С особой осторожностью надо относиться к результатам, полученным с рекомбинантными естественно развернутыми белками, поскольку в них может происходить значительное накопление мутантных форм, как это было показано для альфа-синуклеина. Как минимум, следует выявлять возможные замены тирозиновых остатков на цистеиновые. Обнаружить их достаточно просто по появлению олигомерных форм белка при проведении электрофореза в отсутствие восстанавливающих дисульфидные связи соединений. Очевидно, что именно возникновение «поперечных сшивок», нехарактерных для белков дикого типа, может существенно влиять на процессы амилоидной трансформации, к которой склонны многие естественно развернутые белки, участвующие в возникновении и развитии нейродегенеративных заболеваний амилоидной природы. Таким образом, при моделировании *in vitro* амилоидной трансформации белков следует обязательно учитывать возможность присутствия в препаратах мутантных форм, содержащих замены аминокислотных остатков из-за ошибок, появляющихся на стадии трансляции.

РЕДАКТИРОВАНИЕ МАТРИЧНОЙ РНК АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗАМИ У ЭУКАРИОТ

Редактирование матричной РНК аденозиндезаминазами было обнаружено у различных эукариотических организмов более 20 лет назад [23–25]. Этот фермент, а точнее несколько ферментов, отличающихся по субстратной специфичности, дезаминируют остатки аденозина с образованием инозина. В процессе трансляции инозиновый остаток опознается как гуанозиновый, что приводит к изменению информационного значения триплета. Редактированию матричной РНК аденозиндезаминазами посвящено много экспериментальных статей, в том числе обзорных [26, 27], включая подробный анализ проблемы в статье Ключниковой и соавт. [28]. По этой причине мы не будем останавливаться на редактировании матричной РНК аденозиндезаминазами в целом, а рассмотрим только те аспекты, которые связаны с редактированием, вызывающим замены тирозиновых остатков на цистеиновые в амилоидогенных

белках, связанных с нейродегенеративными заболеваниями. Схема замены тирозиновых остатков на цистеиновые в результате редактирования мРНК аденозиндезаминазами представлена на рис. 2. Тирозиновые остатки в мРНК кодируются двумя триплетами (UAU и UAC) и, следовательно, при дезаминировании аденозина в любом из них возможна замена остатков тирозина на остатки цистеина, кодируемого триплетами UGU и UGC. На первом этапе в результате редактирования ADAR происходит замена аденозинового остатка на инозиновый. Затем инозиновый остаток считывается тРНК^{Cys} как гуанозиновый, что приводит к появлению в полипептидной цепи цистеинового аминокислотного остатка вместо тирозинового. Такая замена может приводить к образованию новых дисульфидных связей в продукте трансляции, причем как внутритропептидных (рис. 2, в), так и межполипептидных.

Как показывают эксперименты на рекомбинантных белках, описанные в предыдущих разделах, замены тирозиновых остатков на цистеиновые в процессе трансляции могут кардинально изменять амилоидную трансформацию естественно развернутых белков. Следовательно, такое изменение их трансформации может происходить в результате редактирования мРНК аденозиндезаминазами из-за появления мутантных форм белков с дополнительным остатком цистеина.

Анализ литературных данных указывает, что аденозиндезаминазы ADAR1, ADAR2 и ADAR3 вовлечены в патогенез неврологических и нейродегенеративных заболеваний [29]. В частности, изменения в профилях редактирования мРНК показаны при болезнях, для которых характерно образование телец включения, таких как болезнь Альцгеймера и Гентингтона [30, 31]. Для большинства случаев неврологических заболеваний показано общее снижение числа замен аденозина на инозин. Для образцов мозга пациентов с диагнозом болезнь Альцгеймера или Гентингтона зарегистрировано уменьшение редактирования в позиции, приводящее к замене 607 остатка глутамата на аргинин в субъединице GluA2 ионотропного рецептора глутамата, что, как полагают, приводит к гибели мотонейронов [32]. Число генов, для мРНК которых показано значимое снижение числа замен аденозина на инозин в процессе развития упомянутых нейродегенеративных заболеваний, растет [33], причем описаны позиции, приводящие к замене тирозина на цистеин, как, например, Tyr571Cys в субъединице GluR6 ионотропного рецептора глутамата [34]. Однако пока отсутствуют прямые экспериментальные данные о влиянии за-

мен тирозиновых остатков на цистеиновые в амилоидогенных белках на нейродегенеративные процессы.

Развитие методов секвенирования нового поколения резко ускорило выявление сайтов замены аденозина на инозин: так, в существующих базах данных зарегистрированы миллионы таких потенциальных сайтов редактирования, предсказанных на основе данных RNA-seq. Одна из таких баз данных, REDIPortal [35], собрана из позиций, для которых секвенированием была выявлена замена А на G, при условии, что ранее в геномных данных не была показана такая однонуклеотидная вариация. На наш взгляд, пристальное внимание следует обратить на сайты редактирования в генах, кодирующих естественно развернутые белки. Во-первых, именно такие белки склонны к амилоидной трансформации и связаны с нейродегенеративными процессами, а, во-вторых, они в меньшей степени будут подвержены деградации в клетке, чем глобулярные белки, не способные свернуться в правильную конформацию из-за замены тирозиновых остатков на цистеиновые. С учетом специфического взаимодействия редактирующих ферментов ADAR1 и ADAR2 с двуцепочечной РНК, с помощью алгоритма поиска потенциальных шпилек в структуре мРНК генов человека было выявлено более тысячи тирозиновых кодонов UAC, которые могут представлять потенциальную мишень для аденозиндезаминаз. Среди генов, содержащих такие кодоны, оказалось 19 тех, что кодируют белки с неструктурированными участками, зарегистрированными в базе данных DisProt [36]. При этом два из найденных генов ассоциированы с нейрогенезом: белок Protein numb homolog (h-Numb, идентификатор UniProt P49757) и белок Paired box protein Pax-6 (идентификатор UniProt P26367). Важно отметить, что в состав белка h-Numb исходно входит четное число цистеиновых остатков, что позволяет предполагать, что редактирование мРНК в данном случае может приводить к появлению нечетного числа цистеиновых остатков и формированию димеров за счет образования межполипептидных дисульфидных связей. Возникновение таких «поперечных сшивок» может быть вовлечено в формирование прочных белковых агрегатов, характерных для амилоидных заболеваний. Если же сузить поиск и обратиться к базе данных RADAR [37], содержащей установленные ранее сайты редактирования РНК, то количество потенциальных кандидатов станет еще меньше. Среди белков, для которых было установлено редактирование UAC-кодона, лишь один можно отнести к естественно развернутым белкам, связан-

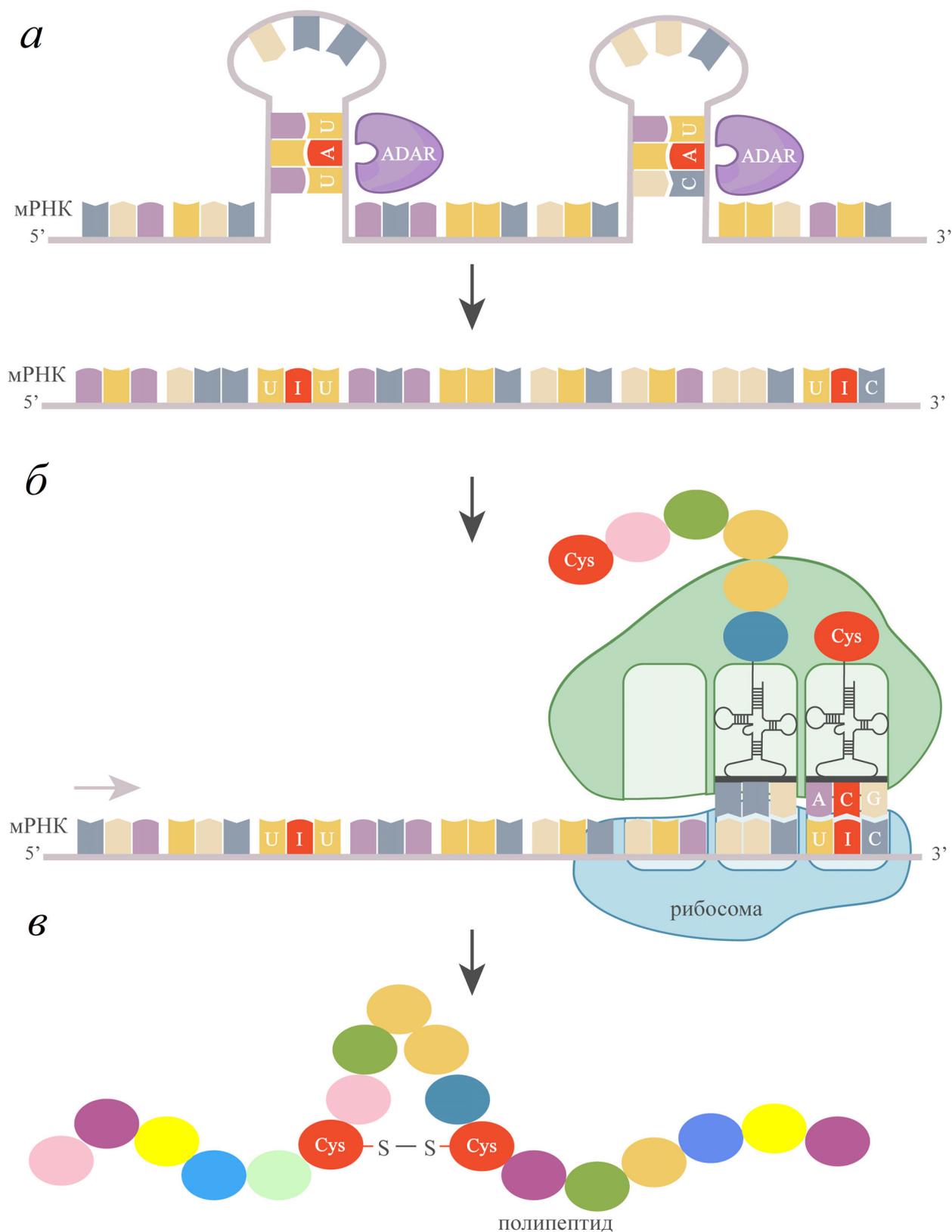


Рис. 2. Дезаминирование остатков аденозина мРНК аденозиндеаминазами (ADAR) у эукариот. *a* – Замена аденозинового остатка на инозиновый в результате редактирования ADAR. *б* – Считывание инозинового остатка тРНК^{Cys} как гуанозинового и появление в полипептидной цепи цистеинового аминокислотного остатка вместо тирозинового. *в* – Образование дисульфидных связей в продукте трансляции

ным с нейродегенерацией — белок септин 4 (идентификатор UniProt O43236). Однако экспериментальные данные о том, что септин 4 действительно может синтезироваться в мутантной форме, есть только на уровне транскриптома [38]. Можно было предположить, что обнаруженные при продукции альфа-синуклеина в *E. coli* замены Tug-Cys могут возникнуть и в эукариотических организмах в результате редактирования мРНК. Тем не менее наши попытки найти замены Tug136Cys в альфа-синуклеине при его продукции в эукариотических клетках (нейробластомы) оказались безрезультатными [39].

Для изучения последствий редактирования РНК на белковом уровне оптимальным подходом является масс-спектрометрическая протеомика, преимущества которой подробно описаны в специальном обзоре [28]. Однако именно при изучении замен Tug-Cys в белках могут возникнуть определенные сложности, а именно, при проведении таких исследований следует учитывать все возможные посттрансляционные модификации цистеиновых остатков (окисление различной степени, образование дисульфидных связей, нитрозилирование, алкилирование). Предотвратить возникновение разнообразных продуктов модификации можно с помощью предварительной обработки белков йодацетатом для получения карбоксиметилированных форм. Таким образом, при проведении масс-спектрометрических исследований необходимо прицельно искать предполагаемые замены Tug-Cys, а не проводить стандартный анализ. Вероятно, оптимальным был бы подход с предварительным биоинформатическим анализом для выявления потенциальных белков-кандидатов. Такой анализ позволил бы оценить, в каких белках, связанных с процессами нейродегенерации, могут происходить замены Tug-Cys вследствие редактирования мРНК аденозиндеаминазами. Это позволило бы затем отобрать наиболее перспективные кандидаты для последующей экспериментальной проверки как с помощью масс-спектрометрического анализа, так и других подходов, включая работу с клеточными культурами и анализ особенностей патологической трансформации амилоидогенных белков с выявленными заменами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре мы обсудили в основном механизмы посттранскрипционных замен тирозиновых остатков на цистеиновые в амилоидогенных белках, поскольку именно такие замены могут приводить к существенным изменениям в про-

цессе их патологической трансформации. Такие изменения возникают из-за необычных свойств цистеиновых остатков, а именно их способности подвергаться окислению и другим модификациям (нитрозилирование, алкилирование и др.), а также образовывать дисульфидные связи. При этом формирование дисульфидных связей может как стабилизировать амилоидные агрегаты за счет «поперечной сшивки» полипептидных цепей, так и препятствовать их амилоидной трансформации из-за образования димерных и олигомерных форм, не склонных к такому типу агрегации.

Единичные наблюдения о замене тирозиновых остатков на цистеиновые в амилоидогенных белках при их продукции в бактериальных системах требуют, на наш взгляд, особого внимания. Так как в препаратах рекомбинантных белков содержание мутантных форм с дополнительными цистеиновыми остатками может достигать 50%, то процесс их амилоидной трансформации может существенно изменяться. Следовательно, требуется проведение дополнительного анализа, позволяющего выявить мутантные белки, содержащие остатки цистеина, и, при необходимости, очистить от них рекомбинантные белки дикого типа. Только после проведения таких процедур можно избавиться от возможных артефактов, возникающих при изучении патологической трансформации амилоидогенных белков из-за присутствия в них мутантных форм.

Изучение роли посттранскрипционных замен тирозиновых остатков на цистеиновые в амилоидогенных белках, происходящих в результате дезаминирования мРНК специальными ферментами, находится на начальной стадии. Хотя о роли редактирования мРНК, особенно в функционировании нервных тканей, в целом известно достаточно много, информация о влиянии такого типа замен (Tug-Cys) в амилоидогенных белках на нейродегенеративные процессы отсутствует. При этом известно, что появление в составе амилоидных белков дополнительных цистеиновых остатков существенно изменяет их способность к патологической трансформации [40, 41]. В целом, дисульфидные связи стабилизируют амилоидные фибриллы, а в случае прионных белков их образование является одним из механизмов трансформации белка в инфекционную форму [42–46]. В бета-амилоидном пептиде, альфа-синуклеине, тау-белке и хантингтине дикого типа нет цистеиновых остатков. Однако введение в эти белки цистеиновых остатков, вызывающих образование межполипептидных и/или внутривнутриполипептидных связей, приводит к кардинальному изменению процесса их

амилоидной трансформации. Эффекты, возникающие при введении остатков цистеина, зависят как от количества замен, так и от их локализации. Некоторые замены ускоряют амилоидогенез, например, за счет образования димерных форм альфа-синуклеина [47, 48] или дрожжевого приона Sup35 [49]. Другие препятствуют формированию амилоидных структур: например, альфа-синуклеин с заменой Tug136Cys [22], альфа-синуклеин с тремя дисульфидными связями [50]. Таким образом, хотя точно предсказать эффекты от замены Tug-Cys сложно, но изучение роли редактирования мРНК, приводящее к таким заменам в амилоидогенных белках,

представляется важным для понимания механизмов возникновения и развития нейродегенеративных заболеваний.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00421).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящий обзор не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nishikura, K. (2010) Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases, *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 321-349, doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-105251.
- Chen, C. X., Cho, D. S., Wang, Q., Lai, F., Carter, K. C., et al. (2000) A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double-stranded RNA binding domains, *RNA*, **6**, 755-767, doi: 10.1017/s1355838200000170.
- Sinigaglia, K., Wiatrek, D., Khan, A., Michalik, D., Sambrani, N., et al. (2019) ADAR RNA editing in innate immune response phasing, in circadian clocks and in sleep, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 356-369, doi: 10.1016/j.bbagr.2018.10.011.
- Roth, S. H., Danan-Gotthold, M., Ben-Izhak, M., Rechavi, G., Cohen, C. J., et al. (2018) Increased RNA editing may provide a source for autoantigens in systemic lupus erythematosus, *Cell Rep.*, **23**, 50-57, doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.036.
- Silvestris, D. A., Picardi, E., Cesarini, V., Fosso, B., Mangraviti, N., et al. (2019) Dynamic inosinome profiles reveal novel patient stratification and gender-specific differences in glioblastoma, *Genome Biol.*, **20**, 33, doi: 10.1186/s13059-019-1647-x.
- Costa Cruz, P. H., and Kawahara, Y. (2021) RNA Editing in Neurological and Neurodegenerative Disorders, in *RNA Editing* (Picardi, E., and Pesole, G., eds.) Springer US, New York, NY, pp. 309-330, doi: 10.1007/978-1-0716-0787-9_18.
- Parker, J. (1989) Errors and alternatives in reading the universal genetic code, *Microbiol. Rev.*, **53**, 273-298, doi: 10.1128/mr.53.3.273-298.
- Loftfield, R. B., and Vanderjagt, D. (1972) The frequency of errors in protein biosynthesis, *Biochem. J.*, **128**, 1353-1356, doi: 10.1042/bj1281353.
- Khazaie, K., Buchanan, J. H., and Rosenberger, R. F. (1984) The accuracy of Qbeta RNA translation. I. Errors during the synthesis of Qbeta proteins by intact *Escherichia coli* cells, *Eur. J. Biochem.*, **144**, 485-489, doi: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb08491.x.
- Kramer, E. B., and Farabaugh, P. J. (2007) The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition, *RNA*, **13**, 87-96, doi: 10.1261/rna.294907.
- Wohlgemuth, I., Garofalo, R., Samatova, E., Güneç, A. N., Lenz, C., et al. (2021) Translation error clusters induced by aminoglycoside antibiotics, *Nat. Commun.*, **12**, 1830, doi: 10.1038/s41467-021-21942-6.
- Zhang, J., Pavlov, M. Y., and Ehrenberg, M. (2018) Accuracy of genetic code translation and its orthogonal corruption by aminoglycosides and Mg²⁺ ions, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 1362-1374, doi: 10.1093/nar/gkx1256.
- Garofalo, R., Wohlgemuth, I., Pearson, M., Lenz, C., Urlaub, H., et al. (2019) Broad range of missense error frequencies in cellular proteins, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 2932-2945, doi: 10.1093/nar/gky1319.
- McNulty, D. E., Claffee, B. A., Huddleston, M. J., Porter, M. L., Cavnar, K. M., et al. (2003) Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*, *Protein Express. Purif.*, **27**, 365-374, doi: 10.1016/s1046-5928(02)00610-1.
- Calderone, T. L., Stevens, R. D., and Oas, T. G. (1996) High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **262**, 407-412, doi: 10.1006/jmbi.1996.0524.
- Huang, Y., O'Mara, B., Conover, M., Ludwig, R., Fu, J., et al. (2012) Glycine to glutamic acid misincorporation observed in a recombinant protein expressed by *Escherichia coli* cells, *Protein Sci.*, **21**, 625-632, doi: 10.1002/pro.2046.
- Liu, Y., Sharp, J. S., Do, D. H.-T., Kahn, R. A., Schwalbe, H., et al. (2017) Mistakes in translation: Reflections on mechanism, *PLoS One*, **12**, e0180566, doi: 10.1371/journal.pone.0180566.
- Zimmerman, S. M., Kon, Y., Hauke, A. C., Ruiz, B. Y., Fields, S., et al. (2018) Conditional accumulation of toxic tRNAs to cause amino acid misincorporation, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 7831-7843, doi: 10.1093/nar/gky623.
- Kramer, E. B., Vallabhaneni, H., Mayer, L. M., and Farabaugh, P. J. (2010) A comprehensive analysis of translational missense errors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *RNA*, **16**, 1797-1808, doi: 10.1261/rna.2201210.
- Rice, J. B., Seyer, J. J., and Reeve, J. N. (1986) Identification of sites of cysteine misincorporation during *in vivo* synthesis of bacteriophage T7 0.3 protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **867**, 57-66, doi: 10.1016/0167-4781(86)90029-1.
- Masuda, M., Dohmae, N., Nonaka, T., Oikawa, T., Hisanaga, S., et al. (2006) Cysteine misincorporation in

- bacterially expressed human α -synuclein, *FEBS Lett.*, **580**, 1775-1779, doi: 10.1016/j.febslet.2006.02.032.
22. Barinova, K. V., Kuravsky, M. L., Arutyunyan, A. M., Serebryakova, M. V., Schmalhausen, E. V., et al. (2017) Dimerization of Tyr136Cys alpha-synuclein prevents amyloid transformation of wild type alpha-synuclein, *Int. J. Biological Macromol.*, **96**, 35-43, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.011.
 23. Kim, U., Wang, Y., Sanford, T., Zeng, Y., and Nishikura, K. (1994) Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11457-11461, doi: 10.1073/pnas.91.24.11457.
 24. Kim, U., and Nishikura, K. (1993) Double-stranded RNA adenosine deaminase as a potential mammalian RNA editing factor, *Semin. Cell Biol.*, **4**, 285-293, doi: 10.1006/scel.1993.1034.
 25. Maas, S., Melcher, T., and Seeburg, P. H. (1997) Mammalian RNA-dependent deaminases and edited mRNAs, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 343-349, doi: 10.1016/S0955-0674(97)80006-3.
 26. Yuting, K., Ding, D., and Iizasa, H. (2021) Adenosine-to-Inosine RNA Editing Enzyme ADAR and microRNAs, *Methods Mol. Biol.*, **2181**, 83-95, doi: 10.1007/978-1-0716-0787-9_6.
 27. Mallela, A., and Nishikura, K. (2012) A-to-I editing of protein coding and noncoding RNAs, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **47**, 493-501, doi: 10.3109/10409238.2012.714350.
 28. Kliuchnikova, A. A., Kuznetsova, K. G., and Moshkovskii, S. A. (2016) ADAR-mediated messenger RNA editing: Analysis at the proteome level, *Biochemistry (Moscow), Suppl. Series B Biomed. Chem.*, **11**, 32-42, doi: 10.18097/PBMC20166205510.
 29. Maas, S., Kawahara, Y., Tamburro, K. M., and Nishikura, K. (2006) A-to-I RNA editing and human disease, *RNA Biol.*, **3**, 1-9, doi: 10.4161/rna.3.1.2495.
 30. Gaisler-Salomon, I., Kravitz, E., Feiler, Y., Safran, M., Biegon, A., et al. (2014) Hippocampus-specific deficiency in RNA editing of GluA2 in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, **35**, 1785-1791, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.018.
 31. Akbarian, S., Smith, M. A., and Jones, E. G. (1995) Editing for an AMPA receptor subunit RNA in prefrontal cortex and striatum in Alzheimer's disease, Huntington's disease and schizophrenia, *Brain Res.*, **699**, 297-304, doi: 10.1016/0006-8993(95)00922-D.
 32. Hosaka, T., Tsuji, H., and Kwak, S. (2021) RNA editing: A new therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis and other neurological diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10958, doi: 10.3390/ijms222010958.
 33. Khermesh, K., D'Erchia, A. M., Barak, M., Annese, A., Wachtel, C., et al. (2016) Reduced levels of protein recoding by A-to-I RNA editing in Alzheimer's disease, *RNA*, **22**, 290-302, doi: 10.1261/rna.054627.115.
 34. Lo Giudice, C., Tangaro, M. A., Pesole, G., and Picardi, E. (2020) Investigating RNA editing in deep transcriptome datasets with REDIttools and REDIportal, *Nat. Protocols*, **15**, 1098-1131, doi: 10.1038/s41596-019-0279-7.
 35. Mansi, L., Tangaro, M. A., Lo Giudice, C., Flati, T., Kopel, E., et al. (2021) REDIportal: Millions of novel A-to-I RNA editing events from thousands of RNAseq experiments, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D1012-9, doi: 10.1093/nar/gkaa916.
 36. Hatos, A., Hajdu-Soltész, B., Monzon, A. M., Palopoli, N., Álvarez, L., et al. (2019) DisProt: Intrinsic protein disorder annotation in 2020, *Nucleic Acids Res.*, **47**, gkz975, doi: 10.1093/nar/gkz975.
 37. Ramaswami, G., and Li, J. B. (2014) RADAR: A rigorously annotated database of A-to-I RNA editing, *Nucleic Acids Res.*, **42**, D109-113, doi: 10.1093/nar/gkt996.
 38. Picardi, E., D'Erchia, A. M., Lo Giudice, C., and Pesole, G. (2017) REDIportal: A comprehensive database of A-to-I RNA editing events in humans, *Nucleic Acids Res.*, **45**, D750-7, doi: 10.1093/nar/gkw767.
 39. Pozdyshev, D. V., Melnikova, A. K., Barinova, K. V., Schmalhausen, E. V., and Muronetz, V. I. (2020) Differences in the synthesis of recombinant α -synuclein in pro- and eukaryotic organisms: Possibility of Tyr136Cys substitution, *Curr. Top. Peptide Prot. Res.*, **21**, 75-81.
 40. Feughelman, M., and Willis, B. K. (2000) Thiol-disulfide interchange a potential key to conformational change associated with amyloid fibril formation, *J. Theor. Biol.*, **206**, 313-315, doi: 10.1006/jtbi.2000.2112.
 41. Li, Y., Yan, J., Zhang, X., and Huang, K. (2013) Disulfide bonds in amyloidogenesis diseases related proteins, *Proteins*, **81**, 1862-1873, doi: 10.1002/prot.24338.
 42. Maiti, N. R., and Surewicz, W. K. (2001) The role of disulfide bridge in the folding and stability of the recombinant human prion protein, *J. Biol. Chem.*, **276**, 2427-2431, doi: 10.1074/jbc.M007862200.
 43. Lee, S., and Eisenberg, D. (2003) Seeded conversion of recombinant prion protein to a disulfide-bonded oligomer by a reduction-oxidation process, *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 725-730, doi: 10.1038/nsb961.
 44. Hosszu, L. L. P., Trevitt, C. R., Jones, S., Batchelor, M., Scott, D. J., et al. (2009) Conformational properties of beta-PrP, *J. Biol. Chem.*, **284**, 21981-21990, doi: 10.1074/jbc.M809173200.
 45. Welker, E., Wedemeyer, W. J., and Scheraga, H. A. (2001) A role for intermolecular disulfide bonds in prion diseases? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4334-4336, doi: 10.1073/pnas.071066598.
 46. Mehlhorn, I., Groth, D., Stöckel, J., Moffat, B., Reilly, D., et al. (1996) High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein, *Biochemistry*, **35**, 5528-5537, doi: 10.1021/bi952965e.
 47. Suk, J.-E., Lokappa, S. B., and Ulmer, T. S. (2010) The clustering and spatial arrangement of beta-sheet sequence, but not order, govern alpha-synuclein fibrillogenesis, *Biochemistry*, **49**, 1533-1540, doi: 10.1021/bi901753h.
 48. Zhou W., and Freed, C. R. (2004) Tyrosine-to-cysteine modification of human alpha-synuclein enhances protein aggregation and cellular toxicity, *J. Biol. Chem.*, **279**, 10128-10135, doi: 10.1074/jbc.M307563200.
 49. Krishnan, R., and Lindquist, S. L. (2005) Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity, *Nature*, **435**, 765-772, doi: 10.1038/nature03679.
 50. Hong, D.-P., Xiong, W., Chang, J.-Y., and Jiang, C. (2011) The role of the C-terminus of human α -synuclein: Intra-disulfide bonds between the C-terminus and other regions stabilize non-fibrillar monomeric isomers, *FEBS Lett.*, **585**, 561-566, doi: 10.1016/j.febslet.2011.01.009.

**POST-TRANSCRIPTIONAL TYROSINE SUBSTITUTIONS
FOR CYSTEINE IN AMYLOIDOGENIC PROTEINS****Mini-Review****V. I. Muronetz^{1,2*}, D. V. Pozdyshev¹, M. V. Medvedeva², and I. A. Sevostyanova¹**¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: vimuronets@belozersky.msu.ru*² *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

The review considers the reasons and consequences of post-transcriptional tyrosine substitutions for cysteine residues. The main attention is paid to Tyr-Cys substitutions that arise during gene expression in bacterial systems at the stage of protein translation as a result of similar mRNA codons misrecognition. Notably, if translation errors generally occur relatively rarely – from 10^{-3} to 10^{-4} errors per codon for *E. coli*, then in some cases the error rate increases significantly. For example, for certain pairs of codons, when the culture conditions change or in the presence of antibiotics. Thus, with the overproduction of recombinant human alpha-synuclein in *E. coli* cells, the content of the mutant form with the replacement of 136 tyrosine residue (UAC codon) with a cysteine residue (UGC codon) can reach 50%. Possible reasons for the increased production of alpha-synuclein with Tyr136Cys substitutions are considered, as well as the consequences of the presence of mutant forms in preparations of amyloidogenic proteins when studying their pathological transformation *in vitro*. A separate section is devoted to Tyr-Cys substitutions occurring due to adenosine deaminases mRNA editing, typical for eukaryotic organisms, and the possible role of this process in the amyloid transformation of proteins associated with neurodegenerative diseases.

Keywords: amyloidogenic proteins, translation errors, Tyr-Cys substitutions